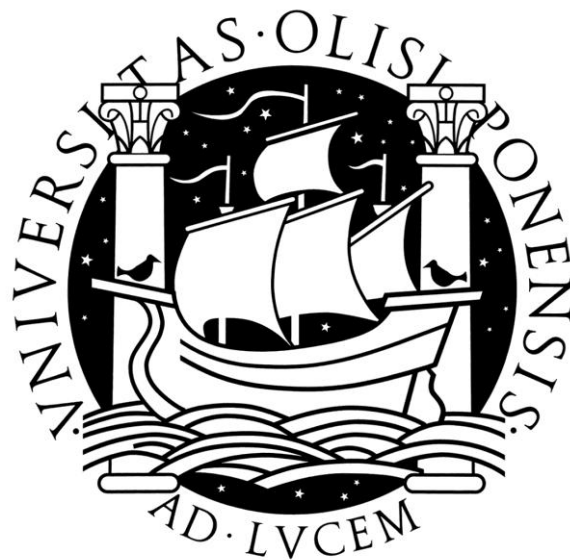


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



EFEITO ANTIBACTERIANO DA FOTOACTIVAÇÃO  
DE IRRIGANTES EM ENDODONTIA

**Marta Baptista Sacadura Biscaia**

MESTRADO INTEGRADO

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



EFEITO ANTIBACTERIANO DA FOTOACTIVAÇÃO  
DE IRRIGANTES EM ENDODONTIA

**Marta Baptista Sacadura Biscaia**

**Dissertação orientada pelo Professor Doutor António Ginjeira**

MESTRADO INTEGRADO

2012

## Agradecimentos

Expresso aqui os meus agradecimentos a todos aqueles que, de forma directa ou indirecta tornaram possível a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Ginjeira, por tudo o que me ensinou ao longo do curso, por se ter disponibilizado a ser o orientador desta dissertação e por todo o apoio e conselhos que me deu.

Aos meus pais por tudo o que me têm proporcionado e por todo o apoio e conselhos que me têm dado ao longo dos anos e de todo o meu percurso académico, apesar das adversidades que fui encontrando ao longo do caminho. Obrigada por me ajudarem a ser a pessoa que sou.

Aos meus irmãos e avó por estarem sempre presentes e alegrarem o meu dia-a-dia.

À Catarina, a minha dupla maravilha por todos os sorrisos, companheirismo, amizade e entreajuda, ao longo destes anos. Foi um prazer trabalhar contigo.

Ao Alexandre, pela sua constante presença, paciência, carinho e apoio que permitiram ultrapassar os momentos mais difíceis deste trabalho e pela força com que sempre me encorajou a nunca desanimar.

E por fim a todos os meus amigos que estão sempre presentes comigo para as coisas boas e menos boas. Vocês são uma base em toda a minha vida.

A todos um sincero obrigado!

## Resumo

Os microrganismos constituem um factor significativo para a manutenção ou aparecimento de lesão periapical. Desta forma, o sucesso do tratamento endodôntico depende da correcta desinfecção do sistema de canais radiculares, sendo a *Enterococcus faecalis* a bactéria mais prevalente em casos de insucesso endodôntico. Ela apresenta elevada patogenicidade, exibindo factores de virulência e sobrevivência que lhe permitem resistir à maioria da medicação intracanal e à preparação químico-mecânica. Tendo em conta que as técnicas convencionais não são capazes de desinfetar os canais de forma previsível e consistente, torna-se necessária uma pesquisa de técnicas, instrumentos e materiais inovadores, com o objectivo de se obter um ambiente limpo e desinfectado, deixando o canal livre de detritos para a obturação. Surge então a Terapia Fotodinâmica, que consiste na associação de um agente fotossensibilizador e uma fonte de luz específica, como o laser de baixa intensidade, gerando espécies de oxigénio altamente reactivas que, em altas concentrações são tóxicas, promovendo a morte de bactérias, fungos e vírus. O objectivo desta monografia é verificar a eficácia da Terapia Fotodinâmica combinada com o tratamento endodôntico convencional com NaOCl na eliminação de *Enterococcus faecalis*. Para isto foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed/ Embase, complementada por uma pesquisa cruzada, considerando as referências bibliográficas dos artigos seleccionados. Conclui-se que, apesar de serem necessários mais estudos para otimizar os protocolos, tornando-os mais previsíveis e passíveis de serem utilizados na prática clínica, a Terapia Fotodinâmica, aliada ao tratamento endodôntico convencional, pode ser considerada um tratamento promissor no controle da infecção endodôntica por *Enterococcus faecalis*.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica; Hipoclorito de sódio; Microbiologia endodôntica

## Abstract

Microorganisms are a significant factor for the maintenance or development of periapical lesions. Therefore, the endodontic treatment success depends on the proper disinfection of the root canal system, aiming at the complete elimination of microorganisms. The most prevalent bacteria in cases of endodontic failure is *Enterococcus faecalis*. It has high pathogenicity, showing virulence and survival factors that allow it to resist most of the intracanal medication and chemo-mechanical preparation. Considering that conventional techniques are not able to disinfect the canals in a predictable and consistent way, it is necessary to search for techniques, instruments and innovative materials in order to obtain a clean and disinfected environment, leaving the channel free of debris in the filling. Then there is the photodynamic therapy, which consists in an association of a photosensitizer plus a specific light source, such as low power laser, generating very short and reactive oxygen species that, in high concentrations, are toxic, promoting the killing of bacteria, fungi and viruses. The aim of this monography is to verify the effectiveness of photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment with NaOCl in eliminating *Enterococcus faecalis*. For this a literature search was performed in *PubMed /Embase* databases, supplemented by a cross-searching, given the references of selected articles. It was concluded that, although additional studies are necessary to optimize the protocols, making them more predictable and easier to be employed in clinical practice, Photodynamic Therapy, used together with the conventional endodontic treatment, may be considered a promising treatment for the control of the endodontic infection by *Enterococcus faecalis*.

**Keywords:** Photodynamic Therapy; Sodium Hypochlorite; Endodontic microbiology

## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract .....	iii
Lista de abreviaturas .....	v
1. Introdução .....	1
2. Materiais e Métodos .....	3
3. Importância da desinfecção no tratamento Endodôntico Convencional .....	4
4. Microbiologia das infecções endodônticas .....	5
4.1. Enterococcus faecalis .....	7
4.1.1. Prevalência .....	7
4.1.2. Patogenicidade.....	8
5. Características da desinfecção do Tratamento Endodôntico Convencional.....	10
6. Terapia Fotodinâmica.....	13
6.1. Efeitos Fototóxicos da Terapia Fotodinâmica .....	14
6.2. Tempo de pré-irradiação.....	15
6.3. Tipos de luz e fotossensibilizadores .....	16
6.4. Vantagens e Desvantagens .....	18
7. Terapia Fotodinâmica como coadjuvante do Tratamento Endodôntico Convencional .....	19
8. Conclusões.....	24
9. Referências Bibliográficas .....	26

## **Lista de abreviaturas**

ADN – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

NaOCl – Hipoclorito de sódio

PCR – Polymerase Chain Reaction

pH – Potencial hidrogeniónico

## 1. Introdução

De acordo com a *American Association of Endodontics* (2011) “Endodontia” é o ramo da Medicina Dentária que estuda a morfologia, fisiologia e patologia da polpa dentária e tecidos perirradiculares (American Association of Endodontics, 2011).

O tratamento endodôntico é a gestão clínica de um problema microbiológico e o seu alvo principal são os microrganismos residentes no sistema de canais radiculares (Ng *et al.*, 2011).

Sem tratamento, a infecção endodôntica leva à progressiva destruição do osso alveolar, podendo ser acompanhada ou não de sintomatologia. Evidências crescentes sugerem que as infecções endodônticas crônicas aceleram a doença arterial coronária, aumentam o risco de infecção de implantes ortopédicos e exacerbam outras doenças inflamatórias crônicas (Bouillaguet *et al.*, 2008).

O objectivo ideal do tratamento endodôntico é a eliminação completa da infecção em todo o sistema de canais. No entanto, geralmente, apenas se consegue reduzir o foco infeccioso para níveis compatíveis com a cicatrização do tecido perirradicular (Siqueira & Roças, 2008; Souza *et al.*, 2010).

Recentes avanços nas técnicas de identificação de microrganismos como, por exemplo, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e a sua aplicação na área da Endodontia, permitiram verificar que através do uso de técnicas endodônticas convencionais, a desinfecção completa do sistema de canais radiculares é de difícil obtenção (Soukos *et al.*, 2006).

O tratamento endodôntico é constituído pela preparação químico-mecânica nomeadamente com instrumentação do sistema tridimensional de canais, com irrigação com agentes desinfectantes e medicação intracanal, que visam a desinfecção do sistema de canais radiculares. Após estes passos, procede-se à obturação, ou seja, à selagem do canal, que impede a re-infecção do dente (Garcez *et al.*, 2007; Garcez *et al.*, 2008; Bouillaguet *et al.*, 2008). No caso de infecção, o uso de antibióticos e anti-sépticos é uma abordagem alternativa, mas o uso a longo prazo de agentes antimicrobianos químicos pode, no entanto, ser neutralizado pelo desenvolvimento de resistência nos organismos alvo (Garcez *et al.*, 2006; Garcez *et al.*, 2008).



Embora a instrumentação mecânica combinada com a irrigação química remova o foco bacteriano infeccioso, no momento da obturação, aproximadamente metade dos dentes apresentam bactérias residuais (Soukos *et al.*, 2006; Fimple *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009).

A correcta desinfecção durante um tratamento endodôntico é considerada como um factor crucial na taxa de sucesso a longo prazo no tratamento endodôntico convencional. Por sua vez, esta depende de vários factores, como a anatomia complexa e diversa do sistema de canais radiculares e a resistência antimicrobiana (Garcez *et al.*, 2006). As bactérias são também localizadas em várias ramificações do sistema de canais radiculares: istmo, irregularidades e túbulos dentinários e podem permanecer inalteradas pelos procedimentos de desinfecção do tratamento endodôntico convencional (Soukos *et al.*, 2006; Dickers *et al.*, 2009). Por outro lado, a presença de uma camada de *smear-layer* após a instrumentação, reduz a eficácia de irrigantes e medicamentos temporários na desinfecção de túbulos dentinários (Soukos *et al.*, 2006).

Hoje em dia, uma das questões mais controversas na Endodontia, é saber se o tratamento de dentes com periodontite apical deve ser concluído numa ou em múltiplas sessões. O estabelecimento de protocolos de tratamento que pode previsivelmente desinfectar os canais radiculares numa visita, tem o potencial para ajudar a resolver essa discussão. Neste sentido, a ideia de acelerar a desinfecção do canal radicular, mantendo a eficácia parece interessante e deve ser prosseguido. A este respeito, o uso de tecnologia laser surge como uma possibilidade na terapia endodôntica (Souza *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas tem sido adquirida muita experiência e conhecimento na tecnologia laser, tendo sido demonstrado que o laser pode ser usado para fornecer resultados comparáveis ou ainda mais eficazes que os tratamentos convencionais (Dickers *et al.*, 2009). Os lasers de alta potência funcionam em função da geração de calor dependente da dose. No entanto, para além de matarem as bactérias, têm o potencial de causar danos colaterais tais como, a carbonização da dentina, anquilose, fusão do cimento, reabsorção radicular e necrose perirradicular, se os parâmetros do laser forem utilizados incorrectamente (Foschi *et al.*, 2007; Garcez *et al.*, 2008; Rios *et al.*, 2011).

Outra abordagem alternativa para eliminar os micorganismos no sistema de canais radiculares por meio de luz laser, envolve o uso de lasers de baixa potência e é denominada por Terapia Fotodinâmica (Dickers *et al.*, 2009).

Esta terapia envolve a utilização de um fotossensibilizador, que é activado pela luz de um determinado comprimento de onda na presença de oxigénio. A transferência de energia do fotossensibilizador activado para o oxigénio disponível resulta na formação de espécies tóxicas de oxigénio, conhecidas como oxigénio singuleto e radicais livres. Estas espécies químicas são altamente reactivas, destruindo proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e outros componentes celulares microbianos (Konopka & Goslinski, 2007).

Desta forma, a Terapia Fotodinâmica surge como uma possibilidade no aumento adicional da eficácia do tratamento convencional com desinfecção mediada por hipoclorito de sódio (Garcez *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2010). O seu interesse na Endodontia está relacionado principalmente pela actividade antimicrobiana, reduzindo comprovadamente a microbiota endodôntica. Além disso, esta terapia é uma técnica de fácil aplicação, indolor, não promove resistência microbiana e não causa efeitos sistémicos (Soukos *et al.*, 2006).

Este trabalho procura compreender com recurso a uma consulta bibliográfica em que medida a Terapia Fotodinâmica combinada com o tratamento convencional será eficaz para a inactivação de *Enterococcus faecalis* e de que modo poderá esta combinação de técnicas ser utilizada para melhorar os protocolos actualmente usados.

## **2. Materiais e Métodos**

Para a realização deste trabalho, foi efectuada uma pesquisa bibliográfica através dos motores de busca: PubMed (Medline) e Embase (Science Direct), tendo como limites o ano de publicação entre 1965 e 2011 e utilizando as seguintes palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Hipoclorito de sódio e Microbiologia endodôntica. Paralelamente, foi realizada uma pesquisa cruzada, considerando as referências bibliográficas dos artigos seleccionados. A pesquisa foi iniciada em Fevereiro de 2012 e finalizada em Maio de 2012. Dos resultados obtidos foram seleccionados 75 artigos com base na relevância para o tema em estudo e disponibilidade dos mesmos.

### 3. Importância da desinfecção no tratamento Endodôntico Convencional

O tratamento endodôntico tem como objectivo primordial a desinfecção tridimensional do sistema de canais criando as condições adequadas para que a lesão perirradicular possa regredir (Stuart *et al.*, 2006; Cohen & Hargreaves, 2007; Siqueira & Roças, 2008; Haapasalo *et al.*, 2010).

Para isso, a instrumentação e desinfecção do sistema de canais são o passo mais importante para se obter um canal próximo do estéril, livre de microrganismos. O grande objectivo é a remoção do conteúdo dos canais e a eliminação da infecção, ou a sua diminuição até se obter uma situação clínica compatível com saúde (Cohen & Hargreaves, 2007; Mahmoudpour *et al.*, 2007).

Os microrganismos, existentes na anatomia do sistema de canais radiculares, não podem ser alcançados pelas defesas do hospedeiro ou pelo uso sistémico de antibióticos (Dunavant *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2006). A sua eliminação dá-se por meio da acção mecânica dos instrumentos e irrigação, da acção antimicrobiana das soluções irrigadoras e da medicação intracanal. Os estudos demonstram que a preparação químico-mecânica com a solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações não elimina completamente todas as bactérias do sistema de canais radiculares e, cerca de 40% a 60% dos canais são positivos para a presença bacteriana (Byström & Sundqvist, 1985; Sjögren *et al.*, 1997; Sedgley *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2007).

Para causar doença persistente, a adaptação ao novo ambiente é crucial para os microrganismos, pois ocorre uma grande redução nos nutrientes disponíveis. Os microrganismos podem adquirir nutrientes nos remanescentes de tecido necrótico localizados em istmos, irregularidades dos canais, túbulos dentinários, ramificações e áreas da raiz não afectadas pela instrumentação e irrigação. A fonte de nutrientes para as bactérias remanescentes pode ainda ser mantida pela infiltração coronária ou apical (Walton, 1976; Siqueira *et al.*, 1997).

Além disso, os patógenos endodônticos têm vindo a desenvolver uma variedade de estratégias para sobreviverem em condições adversas. Eles podem invadir os túbulos dentinários e persistir em camadas superficiais da dentina adjacentes ao lúmen do canal e, podem-se organizar em biofilmes, como comunidades complexas e sésseis, realizando inúmeras mudanças adaptativas comportamentais, a fim de aumentarem a

sua resistência a uma variedade de agentes quimioterápicos, comparando com os seus homólogos planctónicos (Schlafer *et al.*, 2010; Poggio *et al.*, 2011).

O sucesso do tratamento endodôntico é significativamente influenciado pela presença de bactérias no canal radicular no momento da obturação (Sjögren *et al.*, 1997; Waltimo *et al.*, 2005; Siqueira & Roças, 2008).

Portanto, o processo de desinfecção e instrumentação do sistema de canais determina a eficácia do tratamento, criando espaço para permitir o contacto das soluções irrigantes ou da medicação intracanal e as paredes dos canais e otimizar a geometria canal para possibilitar uma adequada obturação (Cohen & Hargreaves, 2007).

#### **4. Microbiologia das infecções endodônticas**

Embora agentes físicos e químicos possam estar envolvidos na patologia endodôntica, fortes evidências determinaram o papel essencial dos microrganismos na etiopatogenia destas patologias pulpare e perirradiculares, e dentre estes, somente as bactérias estão comprovadamente relacionadas. Factores de virulência e produtos do metabolismo bacteriano são responsáveis pelo dano directo do tecido pulpar, enquanto que componentes estruturais da célula bacteriana, como ácido lipoteicóico, podem danificar o tecido indirectamente pela activação de uma resposta imune (Chu *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006; Cohen & Hargreaves, 2007; Sassone *et al.*, 2008).

Para alcançarem o tecido pulpar, as bactérias possuem várias vias de acesso, tais como a exposição dos túbulos dentinários, exposição pulpar directa, por via periodontal, através de infiltrações marginais das restaurações ou através da anacorese hematogénica (Cohen & Hargreaves, 2007).

A infecção primária do canal radicular tem normalmente origem numa lesão de cárie profunda ou numa fractura da coroa do dente que se estende até à câmara pulpar (Barbero *et al.*, 2001). Quando os agentes patogénicos oportunistas, provenientes do meio oral, independentemente da via de entrada, atingem a polpa, desenvolve-se uma reacção inflamatória do hospedeiro designada por pulpíte. Apesar de no início, o tecido pulpar vital se apresentar maioritariamente não infectado, este vai-se transformando progressivamente em tecido necrosado (Hata *et al.*, 1996).

A polpa dentária e os tecidos perirradiculares reagem às infecções bacterianas do mesmo modo que os outros tecidos conjuntivos. A extensão da destruição depende da virulência das bactérias envolvidas e da resistência dos tecidos do hospedeiro. O grau de

resposta pulpar e perirradicular aos irritantes bacterianos varia de uma inflamação tecidual leve à necrose pulpar completa ou osteomielite aguda, com sinais e sintomas sistêmicos de infecção intensa (Hargreaves & Cohen, 2007).

O sistema imunitário é fundamental desde a fase inicial deste processo inflamatório para evitar a extensão da infecção a outras partes do organismo. A resposta do hospedeiro à reacção microbiana baseia-se, em primeiro lugar, no depósito de dentina terciária, com o objectivo de prevenir o acesso dos microrganismos ao tecido pulpar. Dentro da polpa, nas primeiras respostas à infecção pode ocorrer uma resposta inflamatória aguda onde predomina o processo de fagocitose e posteriormente pode ocorrer uma resposta inflamatória crónica com reacções imunitárias associadas. Contudo, à medida que os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro se revelam progressivamente incapazes de aceder ao espaço pulpar necrótico, o sistema radicular acaba por ser colonizado por microrganismos oportunistas, capazes de sobreviverem em condições adversas (Ureña *et al.*, 2002).

Uma infecção endodôntica pode ser classificada de acordo com o momento em que ocorre, determinando se é primária, secundária ou persistente. A infecção primária é aquela que ocorre logo após o estabelecimento e crescimento bacteriano no tecido pulpar. Quando os microrganismos conseguem sobreviver à terapia endodôntica estabelecem infecções persistentes e quando infectam o sistema de canais radiculares durante ou após o tratamento endodôntico, dão origem às infecções secundárias (Cohen & Hargreaves, 2007).

Embora as bactérias sejam, sem dúvida, os microrganismos mais comumente encontrados nas infecções endodônticas, tem sido evidenciada a presença de fungos e vírus, especialmente fungos associados à infecção persistente (Chu *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006; Cohen & Hargreaves, 2007; Sassone *et al.*, 2008; Siqueira & Roças, 2008; Siqueira & Roças, 2009).

Algumas espécies bacterianas, predominantemente as anaeróbias facultativas, são responsáveis por causar periodontite apical. Isto acontece quando existem falhas nos canais radiculares que permitem a entrada de bactérias no sistema canalar após uma obturação ou quando as bactérias não são eliminadas totalmente durante o tratamento endodôntico. Os géneros de bactérias mais frequentemente presentes nesta situação são *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium* e *Actinomyces* (Mickel *et al.*, 2003).

As bactérias presentes em falhas do tratamento são distintas daquelas existentes nos canais das raízes infectadas antes do tratamento endodôntico. Casos de insucesso

estão associados a elevadas proporções de bactérias Gram-positivas, predominando as espécies anaeróbias e facultativas. De todas as bactérias associadas ao insucesso do tratamento endodôntico, a *Enterococcus faecalis* surge como uma das bactérias presentes mais comuns, e raramente é encontrada em grandes proporções nos canais da raiz não tratada (Soukos *et al.*, 2006). Tem sido por isso utilizada em numerosos estudos das propriedades antimicrobianas dos materiais endodônticos (Zhang *et al.*, 2009). A sua prevalência varia de 24% para 77%, o que pode ser explicado pelos seus factores de virulência, incluindo a sua capacidade de competir com outros microrganismos, para invadir os túbulos dentinários e resistir à falta de nutrientes (Sedgley, 2007).

Deste modo, mesmo sabendo que a infecção endodôntica é polimicrobiana, neste trabalho, será dado ênfase à *Enterococcus faecalis*, que é uma bactéria com elevada patogenicidade (Kayaoglu & Orstavik, 2004; Stuart *et al.*, 2006; Ozbek *et al.*, 2009).

#### **4.1. Enterococcus faecalis**

As bactérias do género *Enterococcus*, tal como o nome indica, têm a forma de cocos, sendo bactérias Gram-positivas, não esporuladas, formadoras de colónias e são anaeróbias facultativas, ou seja, têm a capacidade de se desenvolverem na presença ou ausência de oxigénio (Roças *et al.*, 2004; Sedgley *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2006; Ozbek *et al.*, 2009).

A *Enterococcus faecalis* é uma bactéria que existe na microflora normal intestinal e pode habitar a cavidade oral e o sulco gengival. No seu ambiente intestinal, é considerada um organismo comensal que contribui para o metabolismo dos hidratos de carbono, aminoácidos e vitaminas (Kaufman *et al.*, 2005). No entanto, é um microrganismo oportunista que é capaz de invadir eficazmente os túbulos dentinários, estabelecendo uma infecção. Esta sua capacidade deve-se a uma série de factores de virulência e de sobrevivência de que dispõe (Stuart *et al.*, 2006; Kishen *et al.*, 2010).

##### **4.1.1. Prevalência**

A *Enterococcus faecalis* está associada com diferentes formas de doença perirradicular, incluindo infecções endodônticas primárias e infecções persistentes, ou seja, nas raízes obturadas de dentes com lesões periapicais persistentes (Stuart *et al.*, 2006; Kayaoglu *et al.*, 2011). Na categoria das infecções primárias, esta bactéria é mais

comumente associada a lesões crônicas assintomáticas do que a casos sintomáticos de lesões agudas ou abscessos perirradiculares agudos (Sedgley *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2006). A sua associação com a infecção primária é relativamente recente e estudos apontam para uma prevalência de 4-67,5% (Sedgley *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006). Em relação às lesões periapicais persistentes, a sua prevalência é bastante mais elevada, variando de 24 a 77% (Stuart *et al.*, 2006).

#### 4.1.2. Patogenicidade

A *Enterococcus faecalis* possui vários factores de virulência, incluindo certas enzimas líticas, citolisinas, substâncias de agregação, feromonas, ácido lipoteicóico, proteínas de superfície e polissacarídeos celulares. É capaz de aderir às células hospedeiras e expressar proteínas que lhe permitem competir com outras células, alterando a resposta do hospedeiro. Tem ainda a capacidade de suprimir a acção linfocitária, contribuindo potencialmente para o insucesso endodôntico (Love, 2001; Roças *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2006).

Para além dos factores de virulência que possui, é ainda capaz de utilizar os de outras bactérias, beneficiando dos mesmos (Stuart *et al.*, 2006).

Exibe também afinidade com a hidroxiapatite, presente na dentina, explicando a afinidade da *Enterococcus faecalis* em penetrar nos túbulos dentinários e, está envolvida na formação do biofilme (Baik *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

Como factores de sobrevivência, a *Enterococcus faecalis* é capaz de catabolizar várias fontes de energia, como hidratos de carbono, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina e vários  $\alpha$ -aminoácidos (Stuart *et al.*, 2006).

São capazes de sobreviver a ambientes hostis, como pH excessivamente alcalino (11,5) e soluções salinas; resistem a sais biliares, detergentes, metais pesados, etanol e dessecação. Conseguem ainda crescer em intervalos de temperatura de 10-45° e sobreviver a temperaturas de 60° durante 30 minutos (Tendolkar *et al.*, 2003; Kayaoglu & Ørstavik, 2004; Stuart *et al.*, 2006).

Estímulos ambientais podem também regular a expressão de genes deste tipo de bactéria, o que lhes permite adaptar-se à variação das condições ambientais (Stuart *et al.*, 2006; Siqueira & Roças, 2008).

A *Enterococcus faecalis* consegue sobreviver a um pH na ordem dos 11,5, valor este dificilmente alcançado pelos irrigantes no canal radicular, resistindo ao pH

induzido pelo hipoclorito de sódio (NaOCl) e outros agentes de irrigação e de desinfecção, como o hidróxido de cálcio e a clorhexidina. Esta capacidade é conferida pela presença de um sistema de manutenção da homeostasia e por diversos componentes da dentina, incluindo matriz dentinária, colagénio tipo I, hidroxiapatite e soro, que diminuem o efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (Stuart *et al.*, 2006).

Esta bactéria é capaz de adoptar um mecanismo de sobrevivência quando exposta às condições ambientais adversas, incluindo baixas concentrações de nutrientes, elevada salinidade e pH extremo, entrando num estado viável, mas não cultivável. Neste estado, perde a capacidade de crescer em meios de cultura, mas mantém a viabilidade e patogenicidade e, consegue retomar a divisão quando as condições ambientais favoráveis são restabelecidas (Figdor *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2006; Siqueira & Roças, 2008). Consegue manter-se viável durante 12 meses sem nutrientes adicionais, fornecendo portanto um reservatório a longo prazo para a infecção subsequente (Sedgley *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006; Siqueira & Roças, 2008).

Após este período de privação de nutrientes, as células são capazes de recuperar, através da utilização de soro proveniente do osso alveolar e do ligamento periodontal, como fonte nutricional, permitindo à *Enterococcus faecalis* ligar-se às fibras de colagénio tipo I (Love, 2001; Figdor *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2006).

Produz proteínas, tais como, proteases, gelatinase, proteína de ligação ao colagénio, que permitem a sua união à dentina. Desta forma, tem a capacidade de invadir eficientemente os túbulos dentinários, mantendo-se viável no seu interior e escapando à acção dos instrumentos endodônticos e dos agentes microbianos como o NaOCl (Love, 2001; Kayaoglu & Ørstavik, 2004; Roças *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2006; Ozbek *et al.*, 2009).

A presença desta bactéria em biofilme torna-a ainda 1000 vezes mais resistente à fagocitose, anticorpos e aos antimicrobianos, relativamente às bactérias que não se estabelecem em biofilme. Ela tem a capacidade de formar um biofilme monocultural, isto é, uma infecção em que só há um agente infeccioso, a *Enterococcus faecalis* (Stuart *et al.*, 2006; Zehnder, 2006; Jhamb *et al.*, 2010; Dornelles-Morgental *et al.*, 2011).

Alguns estudos defendem que a sua patogenicidade pode estar mais associada com a sua capacidade em resistir aos diversos agentes microbianos do que com os seus factores de virulência (Roças *et al.*, 2004; Sedgley *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2006)

Os factores de virulência e sobrevivência da *Enterococcus faecalis* estão resumidos na tabela I.



<b>Factores de virulência e sobrevivência da <i>Enterococcus faecalis</i></b>
• Resiste a longos períodos de privação de nutrientes
• Liga-se à dentina e invade eficientemente os túbulos dentinários
• Altera as respostas do hospedeiro
• Suprime a acção dos linfócitos
• Possui enzimas líticas, citolisina, substância de agregação, feromonas e ácido lipoteicóico
• Utiliza soro como fonte nutricional
• Resiste a medicamentos intracanales como o hidróxido de cálcio
- Mantém a homeostase do pH
- Propriedades da dentina diminuem o efeito do hidróxido de cálcio
• Compete com outras células
• Forma um biofilme

**Tabela I:** Factores de virulência e sobrevivência da *Enterococcus faecalis* (Stuart *et al.*, 2006).

## 5. Características da desinfecção do Tratamento Endodôntico Convencional

Os canais endodônticos são irregulares, formando sistemas complexos que após a necrose do tecido pulpar, impedem que as bactérias sejam alcançadas pelas células de defesa do hospedeiro e pelos antibióticos administrados sistemicamente. Desta forma, as infecções endodônticas só serão tratadas por processos mecânicos e químicos locais (Siqueira & Roças, 2008).

O tratamento endodôntico convencional baseia-se na instrumentação, limpeza e selagem do sistema de canais radiculares. Os seus principais objectivos são a dissolução completa do tecido pulpar residual, a eliminação de bactérias dos canais radiculares, a prevenção da recontaminação após o tratamento e a manutenção da integridade das estruturas radiculares (Cohen & Hargreaves, 2007; Poggio *et al.*, 2011).

O sucesso do tratamento endodôntico depende então da qualidade de vários factores, incluindo a instrumentação, irrigação, desinfecção e obturação tridimensional dos canais radiculares (Hu *et al.*, 2010).

A preparação mecânica permite a remoção de dentina e tecido pulpar do canal radicular. Algumas escolas defendem a preparação apical com instrumentos de maior calibre, o que permite aceder a locais que não são acessíveis a instrumentos de menor calibre, removendo bactérias intratubulares e abrindo os túbulos dentinários, o que permite uma penetração mais eficiente dos agentes antimicrobianos. Consequentemente o calibre do canal aumenta e adquire uma forma compatível com uma obturação

eficiente, diminuindo o risco de posterior infiltração bacteriana do espaço endodôntico (Stuart *et al.*, 2006).

No entanto, a instrumentação mecânica não consegue eliminar eficientemente as bactérias a partir do sistema de canais radiculares, uma vez que as limas endodônticas não são capazes de alcançar o sistema tridimensional de canais na sua amplitude total (Cohen & Hargreaves, 2007, Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2011; Poggio *et al.*, 2011).

Deste modo, para aumentar a eficácia da preparação mecânica e remoção de bactérias, a instrumentação deve ser suplementada com soluções irrigantes activas, que são consideradas essenciais para o sucesso do tratamento endodôntico. A utilização de uma solução química com capacidades bacteriostáticas ou bactericidas e de dissolução de tecidos é recomendada, a fim de facilitar o desbridamento e a limpeza do espaço do canal radicular (Poggio *et al.*, 2011).

Efeitos mecânicos, químicos e biológicos das soluções irrigantes são cruciais durante a irrigação. Efeitos mecânicos são gerados pelo fluxo e refluxo dos irrigantes no canal radicular, cujo objectivo é eliminar os restos necrosados, lubrificar o canal e dissolver o tecido orgânico e inorgânico. A função biológica está relacionada com o seu efeito antimicrobiano (Hu *et al.*, 2010; Poggio *et al.*, 2011).

As propriedades ideais das soluções irrigantes são (Zehnder, 2006; Cohen & Hargreaves, 2007; Siqueira & Roças, 2008; Haapasalo *et al.*, 2010):

- Biocompatibilidade;
- Lubrificação do canal (redução do atrito durante instrumentação);
- Actividade antimicrobiana;
- Dissolução de tecido necrótico;
- Dissolução de tecido inorgânico (dentina);
- Dissolução de matéria orgânica (colagénio da dentina, tecido pulpar e biofilme);
- Remoção da *smear-layer* (camada microcristalina de detritos orgânicos e inorgânicos nas paredes do canal radicular após a instrumentação);
- Eliminação das bactérias e leveduras (também no biofilme) e inactivação de endotoxinas;
- Penetração nos túbulos dentinários;
- Não irritar ou danificar o tecido periapical vital, sem efeitos cáusticos ou citotóxicos;

- Não enfraquecer a estrutura do dente.

Contudo, não existe ainda nenhuma solução que possua todas as características de um irrigante ideal. O NaOCl é a solução mais comumente utilizada, graças às suas inúmeras vantagens: é um excelente agente antibacteriano, capaz de dissolver tecido necrótico, tecido pulpar vital e os componentes orgânicos da dentina e biofilme, apresenta um largo espectro anti-bacteriano contra esporos, fungos e vírus, possui boas características lubrificantes auxiliando a instrumentação mecânica do canal e tem uma baixa tensão superficial, aumentando a penetração no canal radicular. Além disso, é barato e está facilmente disponível (Siqueira *et al.*, 2000; Bonsor *et al.*, 2006<sup>2</sup>; Siqueira & Roças, 2008; Haapasalo *et al.*, 2010; Poggio *et al.*, 2011).

Apesar de ser considerado como o irrigante de escolha, o NaOCl apresenta desvantagens como sabor desagradável, potencial acção tóxica para os tecidos periapicais e risco de edema ou formação de hematoma se houver extrusão para além do foramen apical, penetração limitada nos túbulos dentinários, perda da eficácia ao longo do tempo, actuação apenas por contacto e risco de acidentes na sua manipulação (Gambarini, 1999; Bonsor *et al.*, 2006<sup>2</sup>).

O NaOCl tem propriedades antissépticas devido a formação de ácido hipocloroso e subsequente libertação de cloro, que é um bactericida muito activo. Cloro livre no NaOCl dissolve o tecido necrótico, uma vez que quebra as proteínas em aminoácidos (Bonsor *et al.*, 2006<sup>1</sup>; Poggio *et al.*, 2011).

Para se obter este efeito, as concentrações recomendadas para a sua utilização variam de 0,5-6%. Concentrações acima deste valor aumentam o seu efeito tóxico, não aumentando a acção antibacteriana (Clarkson *et al.*, 2003; Haapasalo *et al.*, 2010).

Manipulações que aumentam a eficácia do NaOCl incluem o aquecimento da solução. Tem sido mostrado que o aumento da temperatura de 22°C para 45°C fortalece tanto a sua capacidade de dissolução dos tecidos como a sua acção antibacteriana (Poggio *et al.*, 2011). A eficácia deste irrigante varia consoante diversos factores tais como, temperatura, concentração, volume, fluxo, profundidade da agulha, tempo de armazenamento e tempo de actuação no canal (Siqueira *et al.*, 2000).

O NaOCl, mesmo sendo um agente antimicrobiano altamente eficaz, não tem capacidade de dissolver a *smear-layer* sozinho das paredes dentinárias, ele afecta a sua porção orgânica, permitindo que posteriormente os agentes quelantes a removam (Zehnder, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010; Poggio *et al.*, 2011).

Por outro lado, ele penetra a uma profundidade de cerca de 130 µm nos túbulos dentinários, ao passo que a infecção tubular pode ocorrer mais perto da junção amelodentinária, até 1000 µm (Rios *et al.*, 2011).

Os agentes quelantes (EDTA ou ácido cítrico) auxiliam na desmineralização e dissolução das partículas inorgânicas da *smear-layer*, complementando a acção do NaOCl, que apenas tem capacidade de dissolver a parte orgânica (Zehnder, 2006; Poggio *et al.*, 2011).

Para além da sua capacidade de limpeza, os agentes quelantes podem separar os biofilmes que aderem às paredes do canal radicular. Assim, a utilização do NaOCl alternado com o EDTA pode ser mais eficiente na redução das cargas bacterianas do que o NaOCl por si só. O EDTA pode também ser utilizado no protocolo de irrigação final nas situações em que o NaOCl é utilizado em concentrações mais elevadas (Zehnder, 2006). O EDTA é mais frequentemente utilizado na concentração de 17% (Haapasalo *et al.*, 2010).

Tanto o ácido cítrico como o EDTA, reduzem imediatamente os iões de cloro disponíveis em solução, tornando o NaOCl ineficaz contra as bactérias e tecido necrosado. Deste modo, os agentes quelantes nunca devem ser misturados com o NaOCl, numa só solução (Zehnder, 2006).

O NaOCl é um irrigante eficaz para todas as formas de *Enterococcus faecalis*, incluindo a sua existência como um biofilme. Contudo, o EDTA tem pouca actividade antibacteriana, mas é importante a sua capacidade para remover a porção inorgânica da *smear-layer*, permitindo assim o acesso de outros irrigantes aos túbulos dentinários (Byström & Sundqvist, 1985; Stuart *et al.*, 2006).

Contudo, apesar da eficácia do NaOCl juntamente com o EDTA, estudos epidemiológicos sugerem que 30-50% dos tratamentos dos canais radiculares falham devido a infecção residual. Esta percentagem de falhas sugere fortemente que as actuais técnicas endodônticas são melhoráveis e que são necessárias estratégias de desinfecção suplementares (Bouillaguet *et al.*, 2008).

## 6. Terapia Fotodinâmica

O uso da Terapia Fotodinâmica para a inactivação de microrganismos foi exibido pela primeira vez, há mais de 100 anos, quando Oscar Raab reportou o efeito letal de cloridrato de acridina em *Paramecia caudatum* (Pagonis *et al.*, 2010).

A Terapia Fotodinâmica, também conhecida como PDT, acrónimo de *Photodynamic Therapy*, originalmente desenvolvida como uma opção terapêutica para o cancro, é baseada num conceito em que um agente não tóxico fotossensibilizante, conhecido como fotossensibilizador pode ser localizado preferencialmente em certos tecidos e, subsequentemente activado pela luz de comprimento de onda adequado para gerar oxigénio singuleto e radicais livres que são citotóxicos para as células do tecido alvo (Pagonis *et al.*, 2010). Recentemente, a PDT tem sido utilizada para erradicar microrganismos ao nível do sistema de canais radiculares *in vitro* e *in vivo*, sugerindo a sua utilidade como adjuvante às actuais técnicas de desinfecção (Fimple *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2011).

Os componentes necessários para os efeitos mediados pela Terapia Fotodinâmica incluem portanto, oxigénio, fotossensibilizador e luz, cuja dosimetria adequada, que é multifactorial, é importante para o tratamento eficaz.

## **6.1. Efeitos Fototóxicos da Terapia Fotodinâmica**

O agente fotossensibilizador é colocado em contacto com as células alvo e absorvendo a luz, desencadeia dois mecanismos de acção que originam a lise celular (Bouillaguet *et al.*, 2008). A reacção do tipo I com água em meio microbiano, pode elevar os radicais hidroxila, que por sua vez, podem reagir com biomoléculas ou podem-se combinar para formar peróxido de hidrogénio *in situ*. Os subsequentes resultados citotóxicos incluem a remoção de hidrogénio de moléculas insaturadas, como os fosfolípidos da membrana plasmática bacteriana, alterando a permeabilidade e integridade da membrana. A inactivação de enzimas da membrana e receptores também é possível. Na reacção do tipo II, o fotossensibilizador no estado tripleto transfere a sua energia para o oxigénio molecular, formando *in situ* o oxigénio singuleto, que então reage rapidamente com componentes celulares, como a parede celular, ácidos nucleicos, peptídeos e moléculas envolvidas na manutenção estrutural da parede/ membrana celular, tais como fosfolípidos, esteróides e peptídeos. O curto período de vida do oxigénio singuleto novamente assegura uma resposta localizada (Wainwright, 1998).

É difícil fazer a distinção entre os dois tipos de mecanismos, mas em ambos o mecanismo de dano à célula-alvo é dependente da tensão de oxigénio e concentração do fotossensibilizador (Konopka & Goslinski, 2007). Contudo, a reacção do tipo II é

geralmente aceite como o principal caminho fotooxidativo no dano celular microbiano (Wainwright, 1998; George & Kishen, 2008).

Esta técnica leva a uma baixa toxicidade para o hospedeiro. Neste âmbito, Garcez *et al.*, 2008 referem que os mecanismos de acção da PDT apresentam selectividade na destruição de microrganismos bacterianos quando comparando a mesma acção sobre células do hospedeiro (Garcez *et al.*, 2008). Esta selectividade deve-se a sistemas de resistência à reacção oxidativa mais desenvolvidos existentes nas células do hospedeiro quando comparados aos microrganismos a eliminar. Os genes bacterianos não incluem proteínas antioxidantes, tais como catalase ou superóxido dismutase, que ajudam as células do hospedeiro a neutralizar o stress oxidativo (Bouillaguet *et al.*, 2008).

Por outro lado, como a interacção do oxigénio altamente reactivo com as moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser alvo para a Terapia Fotodinâmica. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência bacteriana, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização, além da morte celular. Além disso, o procedimento pode ser repetido várias vezes, uma vez que não há efeitos cumulativos e é, usualmente, não invasivo (Carré *et al.*, 1999; Kömerik & Wilson, 2002).

## **6.2. Tempo de pré-irradiação**

O tempo de pré-irradiação corresponde ao tempo decorrido entre a aplicação do fotossensibilizador no alvo e a sua activação pela luz. É um ponto crítico para o sucesso da PDT, uma vez que, se o fotossensibilizador não estiver próximo do alvo, a sua activação pela luz irá resultar na formação de espécies tóxicas em local não desejado (Wainwright *et al.*, 1997). A morfologia microbiana pode variar com as espécies, causando diferenças na localização do fotossensibilizador (Wainwright, 1998).

Desta forma, o tempo de pré-irradiação é equivalente ao tempo necessário para a absorção do corante antes da iluminação (Wainwright, 1998) e, portanto espera-se que o corante se una ao microrganismo ou chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular e neste período o fotossensibilizador não sofra degradação antes da activação pela fonte de luz.

### 6.3. Tipos de luz e fotossensibilizadores

Duas fontes de luz diferentes têm sido testadas na Terapia Fotodinâmica. A luz de espectro vermelho funciona com comprimento de onda com cerca de 630 nm e, a luz de espectro azul funciona com comprimento de onda na ordem dos 380 nm a 500 nm.

Como possui um comprimento de onda mais curto, a luz de espectro azul, tem mais energia disponível para promover a formação de espécies de oxigénio reactivo, após tempos de exposição mais curtos. No entanto, existem poucos fotossensibilizadores estudados que se activem nestes espectros de luz (Bouillaguet *et al.*, 2008).

Actualmente, são utilizados lasers de diodo de baixa potência, emitindo luz de espectro vermelho, por serem bem absorvidos pelos tecidos biológicos. Esta luz conjugada com fotossensibilizadores como o azul de metileno ou azul de toluidina, tem sido apontada como uma técnica promissora para aumentar a desinfecção do tratamento endodôntico (Garcez *et al.*, 2008).

Considerando a variação da anatomia radicular externa e a ramificação do sistema de canais na sua porção interna, vários autores referem na literatura sobre a Terapia Fotodinâmica, o uso de uma fibra óptica introduzida no canal radicular para distribuir a luz homogeneamente sobre toda a superfície. Esta fibra garante uma melhor foto reacção ao irradiar a luz na totalidade dos 360° do canal, desde a sua porção coronal até ao terço apical (Soukos *et al.*, 2006; Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008; Garcez *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010).

Fotossensibilizadores são moléculas que possuem uma propriedade especial: a absorção de luz, utilizando a energia para realizar reacções químicas em células. Eles têm a capacidade de gerar espécies citotóxicas de oxigénio quando irradiados com luz de comprimento de onda apropriado. Após a absorção de um fotão, a molécula de fotossensibilizador será excitada para um nível superior de energia. A molécula vai então, perder a sua energia e, durante este processo uma reacção de transferência de electrões pode ocorrer ou o energético pode ser transferido para o meio ambiente. O processo de transferência de energia pode levar a reacções oxidativas, que são tóxicas para as células, principalmente se ocorrerem na vizinhança do microrganismo ou no seu espaço intracelular (Garcez *et al.*, 2006).

O fotossensibilizador deve possuir uma banda de absorção ressonante com o comprimento de onda da fonte de luz a ser utilizada; deve possuir estabilidade

biológica, eficiência fotoquímica, selectividade pela célula-alvo e mínimo efeito tóxico sobre as células normais (Wainwright *et al.*, 1997).

A fotossensibilização de bactérias está relacionada com a carga do fotossensibilizador. Em geral, os de carga neutra ou positiva interagem eficientemente e inactivam bactérias Gram-positivas, enquanto que interagem em alguma extensão na membrana externa de bactérias Gram-negativas. A camada de poros de peptidoglicano e ácido lipoteicóico na membrana citoplasmática externa das bactérias Gram-positivas permite a difusão do fotossensibilizador. A membrana externa das bactérias Gram-negativas age como uma barreira física e funcional entre as células e o meio biológico (Wainwright *et al.*, 1997; Hamblin & Hasan, 2004). A sensibilidade fotodinâmica das bactérias Gram-negativas altera-se em paralelo com o coeficiente de permeabilidade transmembranar dos canais das proteínas porina na membrana externa e, portanto, esta característica destes microrganismos pode ter um efeito sobre a destruição bacteriana total. Por sua vez, a hidrofília e a carga do fotossensibilizador determina a forma como ele atravessa os canais das proteínas porina na membrana externa (Usacheva *et al.*, 2001).

Na endodontia, os fotossensibilizadores derivados das fenotiazinas têm sido amplamente empregados nas pesquisas envolvendo a Terapia Fotodinâmica (Soukos *et al.*, 2006; Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008), sendo o azul de metileno e o azul de toluidina os mais estudados para a promoção da desinfecção canalar contra espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas (Souza *et al.*, 2010). Ambos apresentam estruturas químicas semelhantes e exibem propriedades físico-químicas semelhantes, sendo os dois fotossensibilizadores eficientes contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando luz de espectro vermelho. No entanto, a sua eficácia relativa contra os organismos Gram-positivos e Gram-negativos é diferente, sendo determinada pela concentração letal mínima dos corantes. Esta distinção pode ser atribuída às diferenças existentes na estrutura e composição entre as Gram-positivas e as Gram-negativas, em particular na existência de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas (Usacheva *et al.*, 2001).

O azul de metileno é um corante orgânico, cujas propriedades hidrófilas, juntamente com o seu baixo peso molecular e carga positiva permitem a sua passagem através dos canais da proteína-porina presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas. O azul de metileno, predominantemente interage com a macromolécula aniónica de lipopolissacárido, resultando na geração de dímeros de azul



de metileno, que participam no processo de fotossensibilização. Desta forma, este corante exerce um potencial efeito fototóxico na membrana celular das bactérias Gram-positivas e negativas e no seu DNA (Soukos *et al.*, 2006; Fimple *et al.*, 2008). Este fotossensibilizador funciona num espectro de luz que se activa por volta dos 656 nm e Fimple *et al.*, 2008 referem que possui capacidade de se infiltrar nos túbulos dentinários (Fimple *et al.*, 2008).

O azul de toluidina é um agente fotossensibilizador usado na terapia fotodinâmica com laser de luz vermelha absorvendo a luz com comprimento de onda que varia entre os 620 e 660 nm desencadeando a libertação de espécies reactivas de oxigénio (Soukos *et al.*, 2006).

A concentração necessária de fotossensibilizador que leva à morte de microrganismos devido à actividade fotodinâmica, depende do corante, dos parâmetros de irradiação e do género das bactérias. Normalmente, a concentração dos fotossensibilizadores varia entre 5 a 200 µmol/ L, dependendo da susceptibilidade das bactérias e das condições de irradiação (Garcez *et al.*, 2006).

#### **6.4. Vantagens e Desvantagens**

Algumas limitações são apontadas à Terapia Fotodinâmica como o trauma térmico dos tecidos envolventes e o risco de pigmentação permanente dos dentes (Foschi *et al.*, 2007; Bouillaguet *et al.*, 2008).

Há um desenvolvimento de calor no canal da raíz durante a irradiação (Soukos *et al.*, 2006), uma vez que os fotões quando são absorvidos pelo tecido dentário, a energia electromagnética é convertida em energia mecânica (Dickers *et al.*, 2009). Contudo, em relação ao risco de trauma térmico, Dickers *et al.*, 2009 reportam que os lasers de baixa potência associados à Terapia Fotodinâmica não sobreaquecem os tecidos periapicais mesmo quando submetidos a longos períodos de irradiação (Dickers *et al.*, 2009).

Por outro lado, esta técnica não invasiva oferece as seguintes vantagens, quando aplicada *in vivo*: aplicação rápida do corante no canal radicular; morte bacteriana rápida depois de um curto tempo de tratamento; penetração de biofilmes e túbulos dentinários pelo fotossensibilizador; penetração e citotoxicidade limitada do fotossensibilizador e da luz para o ligamento periodontal e osso adjacente; ausência de efeitos secundários térmicos nos tecidos em torno das raízes (Soukos *et al.*, 2006). Deve-se realçar que a

sua acção selectiva é uma das características mais importantes, uma vez que em baixas concentrações apresenta-se letal para as bactérias patogénicas, quando comparada com as exigidas para matar células normais, não causando, portanto, dano nestas células (Kömerik & Wilson, 2002; Garcez *et al.*, 2006).

## **7. Terapia Fotodinâmica como coadjuvante do Tratamento Endodôntico Convencional**

Nas últimas décadas, a Endodontia evoluiu substancialmente com o desenvolvimento e a adopção de novas tecnologias e materiais, facilitando o trabalho do endodontista e diminuindo o tempo na execução do tratamento endodôntico. Apesar disto, a maioria das falhas ou insucessos endodônticos, está relacionada com a persistência de microrganismos que resistiram à preparação químico-mecânica ou à medicação intracanal (Siqueira & Roças, 2008).

A eliminação da microflora patogénica do sistema de canais radiculares é um dos principais objectivos do tratamento endodôntico (Garcez *et al.*, 2008). Os microrganismos e seus subprodutos assumem um papel crucial no desenvolvimento de infecção na polpa e nos tecidos periapicais (Kakehashi *et al.*, 1965).

Microrganismos localizados em ramificações, istmos e túbulos dentinários podem escapar dos efeitos dos instrumentos e irrigantes usados durante o procedimento químico-mecânico de limpeza do sistema de canais radiculares (Nair *et al.*, 2005).

*Enterococcus faecalis* tem sido a espécie mais frequentemente associada a dentes com lesão periapical persistente após tratamento endodôntico. Esta bactéria tem sido amplamente utilizada como um valioso marcador microbiológico para estudos *in vitro*, sendo a sua utilização profusamente aprofundada na literatura (Souza *et al.*, 2010).

Torna-se, portanto, necessária a utilização de recursos como medicação intracanal, radiação laser e Terapia Fotodinâmica na busca de eficiente desinfecção do sistema de canais radiculares (Nair *et al.*, 2005; Bergmans *et al.*, 2008; Garcez *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2011).

Desta forma, a Terapia Fotodinâmica surge como uma nova terapia, coadjuvante ao tratamento endodôntico, na tentativa de eliminar microrganismos persistentes à preparação químico-mecânica (Garcez *et al.*, 2006; Soukos *et al.*, 2006; Garcez *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008; Garcez *et al.*, 2008).

Vários estudos sugerem que a Terapia Fotodinâmica oferece uma destruição adicional dos microrganismos remanescentes, quando associada ao tratamento endodôntico convencional, ou seja, depois de se utilizar o hipoclorito de sódio ou o ácido cítrico e o hipoclorito de sódio como co-irrigantes (Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008; Garcez *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010).

Na maioria dos estudos analisados, foram avaliados os efeitos usando a Terapia Fotodinâmica imediatamente após os procedimentos de instrumentação e irrigação, o que é a principal forma proposta para aplicar esta terapia ao tratamento endodôntico, isto é, como um suplemento e não como uma alternativa aos procedimentos químico-mecânico. Os procedimentos de instrumentação e irrigação geram um stress ambiental no canal radicular e podem romper as estruturas do biofilme, sendo portanto métodos que tornam os membros da comunidade bacteriana mais sensíveis à actividade antibacteriana da Terapia Fotodinâmica. No entanto, as bactérias organizadas em biofilmes podem permanecer intactas em algumas áreas após a instrumentação e, a sua permanência pode representar um risco para o resultado do tratamento, fazendo com que uma abordagem antibacteriana suplementar seja necessária. Assim, seria de esperar que a Terapia Fotodinâmica seja capaz de completar os efeitos antibacterianos da instrumentação/ irrigação, reduzindo significativamente ou idealmente os microrganismos residuais (Garcez *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2010).

Entre os fotossensibilizadores mais utilizados em Endodontia estão as fenotiazinas como o azul de metileno e o azul de toluidina, com grande eficácia antimicrobiana quando conjugados com a Terapia Fotodinâmica, comprovada por estudos *in vitro* (Soukos *et al.*, 2006; Foschi *et al.*, 2007; George & Kishen, 2007; George & Kishen, 2008; Bergmans *et al.*, 2008; Fimple *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2011).

Não foi demonstrada diferença significativa entre a capacidade foto-oxidativa do azul de metileno e do azul de toluidina (Souza *et al.*, 2010). O fotossensibilizador ou laser isolados não apresentaram propriedades antibacterianas (Garcez *et al.*, 2006; Soukos *et al.*, 2006).

A Terapia Fotodinâmica mostrou-se mais eficiente que o laser na eliminação de *Enterococcus faecalis* em todos os estudos que fizeram a comparação directa entre o efeito bactericida do laser e da Terapia Fotodinâmica (Soukos *et al.*, 2006; Foschi *et al.*, 2007; Bergmans *et al.*, 2008).

Os estudos que sugerem o potencial da Terapia Fotodinâmica para ser utilizada como um procedimento antimicrobiano adjuvante após a preparação químico-mecânica

do tratamento endodôntico convencional, mostraram que a solução química reduziu em 93,25% a carga microbiana e que a redução proporcionada pelo efeito coadjuvante da Terapia Fotodinâmica alcançou 97-99,2% (Garcez *et al.*, 2006, Soukos *et al.*, 2006; Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008; Garcez *et al.*, 2010). A Terapia Fotodinâmica alcançou uma redução de cerca de 77,5-80% na viabilidade da *Enterococcus faecalis* (Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008).

Contudo, vários resultados obtidos indicam que os protocolos utilizados na Terapia Fotodinâmica podem não completar significativamente os efeitos antibacterianos dos procedimentos químico-mecânicos usando o hipoclorito de sódio, como irrigante principal no canal, contra uma cultura pura de *Enterococcus faecalis* (Souza *et al.*, 2010). Os estudos concluíram que a Terapia Fotodinâmica promoveu uma significativa redução do número de *Enterococcus faecalis* intracanal, ou seja, a associação entre o tratamento convencional e a Terapia Fotodinâmica aumentou o número de ocorrências de culturas negativas obtidas a partir dos canais radiculares. No entanto, ressaltam que essa terapia, apesar da sua eficácia, não erradica completamente a microbiota do canal, pois evidenciam que há persistência de microrganismos após a preparação e Terapia Fotodinâmica mesmo com medicação intracanal (Garcez *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2010).

A incompleta eliminação bacteriana nos túbulos dentinários pode ser devida à penetração incompleta de azul de metileno nos túbulos, o que pode estar relacionada com interações na ligação com componentes da dentina; falha na difusão do fotossensibilizador nos biofilmes de bactérias que persistem intocados nas paredes do canal bem como, a incapacidade da luz penetrar nas camadas mais profundas dos biofilmes e, à insuficiente oxigenação (Dickers *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2011).

A reduzida susceptibilidade dos biofilmes à Terapia Fotodinâmica foi atribuída à reduzida penetração do fotossensibilizador. Além disso, tem sido demonstrado que fotossensibilizadores fenotiazínicos, incluindo azul de metileno e azul de toluidina, são substratos de drogas multiresistentes em bactérias, diminuindo a eficácia do fotossensibilizador (Pagonis *et al.*, 2010). A resposta bacteriana é modulada pelas quantidades tanto de fotossensibilizador como de luz. A luz propaga-se na dentina, sendo os túbulos dentinários os seus principais dispersores. Deste modo, e uma vez que os componentes necessários para os efeitos mediados pela Terapia Fotodinâmica incluem oxigênio, fotossensibilizador e luz, a dosimetria adequada é importante para o

tratamento eficaz (Foschi *et al.*, 2007). Em relação à baixa concentração de oxigénio disponível nos canais, especialmente nas irregularidades ou nos túbulos dentinários, sob tais condições, a formação de derivados de oxigénio citotóxicos pode ser impedida ou minimizada. Em situações clínicas, as baixas condições de oxigénio deverão ser ainda mais críticas (Souza *et al.*, 2010). Além disso, bactérias diferentes da *Enterococcus faecalis*, que podem estar envolvidas no fracasso do tratamento endodôntico, podem apresentar diferente susceptibilidade à Terapia Fotodinâmica (Foschi *et al.*, 2007). Também ficou claro, que alguns microrganismos obrigam a tempos mais longos de irradiação do que outros para serem mortos (Diskers *et al.*, 2009).

Para superar as deficiências anteriormente descritas, diversos estudos têm proposto o desenvolvimento de sistemas de distribuição de drogas, de modo a melhorar as características farmacológicas do azul de metileno (Pagonis *et al.*, 2010).

Estudos recentes envolvendo a Terapia Fotodinâmica, têm-se centrado na utilização de um polímero baseado em nanopartículas para a distribuição do fotossensibilizador e sistemas de libertação, em particular polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, a fim de aumentar a fotodestruição de biofilmes nos canais. Estes sistemas são capazes de alcançar os diferentes órgãos e controlar a libertação das moléculas de fotossensibilizador pela incorporação de porções em locais específicos (por exemplo, a modificação da superfície das partículas com óxido de polietileno para melhorar a biocompatibilidade do transportador e a biodistribuição). As nanopartículas contendo fotossensibilizadores têm diversas vantagens em relação às moléculas fotossensibilizantes não encapsuladas em nanopartículas. Estas vantagens incluem: (1) uma maior massa crítica (pacote concentrado de fotossensibilizador) para a produção de espécies de oxigénio reactivo que destroem as células; (2) limitação da capacidade da célula alvo para bombear a molécula de fotossensibilizador para fora, reduzindo assim a possibilidade de resistência a drogas; (3) selectividade de tratamento através de agentes de entrega localizados; e (4) a matriz não imunogénica de nanopartículas (Pagonis *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2011).

No estudo de Pagonis *et al.*, 2010 foi utilizada uma matriz de nanopartículas de PLGA (poly (D, L-lactide-coglycolide)) carregada de moléculas de azul de metileno e avaliaram a capacidade das nanopartículas em distribuir o fotossensibilizador pelos biofilmes presentes nos canais radiculares infectados, permitindo a sua eliminação utilizando a Terapia Fotodinâmica. PLGA é um copolímero de poliéster de ácido

poliláctico e ácido poliglicólico, biocompatível e biodegradável, ou seja, tem a capacidade de se degradar no corpo através de vias naturais (Pagonis *et al.*, 2010).

Também George & Kishen, 2008 concluíram que o uso de fotossensibilizadores contendo transportadores de oxigénio são capazes de promover a ruptura do biofilme bacteriano e inactivar bactérias, pois verificaram redução da espessura e descontinuidade da estrutura do biofilme. A acção complementar desempenhada pelo transportador de oxigénio assegura uma concentração adequada de oxigénio que degrada a matriz do biofilme bacteriano, bem como auxilia também na penetração do fotossensibilizador. Pensa-se, que o aumento da formação de oxigénio singuleto seja responsável pela completa inactivação e ruptura do biofilme maduro (George & Kishen, 2008).

No que diz respeito à oxigenação insuficiente, George *et al.*, 2008 e Ng *et al.*, 2011, propuseram a associação do azul de metileno ao transportador de oxigénio perfluordecáhidronaftaleno e ao agente oxidante peróxido de hidrogénio no sistema de canais radiculares para realçar o efeito da Terapia Fotodinâmica (George *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2011).

Estudos apresentam diferentes percentagens na redução bacteriana, o que pode ser explicado pelas condições envolvidas no sucesso da terapia. Por exemplo, diferentes espécies bacterianas apresentam sensibilidade diferente à Terapia Fotodinâmica e, consequentemente, espécies reactivas de oxigénio não são igualmente tóxicas para todos os microrganismos. O comprimento de onda da luz, a absorvância do fotossensibilizador, a potência e intensidade da luz e, o tempo de exposição podem também desempenhar um papel nos resultados, porque para obter o melhor resultado, o fotossensibilizador tem de ser eficientemente excitado pela fonte de luz (Garcez *et al.*, 2006). O fotossensibilizador deve, idealmente, apresentar baixos níveis de toxicidade e exibir toxicidade selectiva contra as células alvo após activação. O seu pico de absorção deve corresponder ao comprimento de onda da luz usada na irradiação, de forma a promover a formação de oxigénio singuleto, uma espécie de oxigénio muito reactivo principalmente responsável pela morte bacteriana mediada pela Terapia Fotodinâmica (Souza *et al.*, 2010). Assim, diferenças metodológicas entre os estudos que empregam a Terapia Fotodinâmica dificultam comparações entre eles, pois utilizam fotossensibilizadores diferentes, bem como diferentes parâmetros de luz e de técnicas de transmissão de luz (Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008).

Desta forma, são necessários mais estudos, contendo várias espécies envolvidas na infecção canalar, para determinar a concentração óptima de fotossensibilizador e se continuar na optimização da dosimetria da luz, a fim de maximizar a morte bacteriana, a qual juntamente com o tratamento endodôntico convencional, tem por objectivo minimizar o risco de insucesso endodôntico (Soukos *et al.*, 2006; Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008).

## 8. Conclusões

A máxima desinfecção do sistema de canais radiculares é ao mesmo tempo o objectivo e um desafio para a terapia endodôntica. Assim, destaca-se o interesse pela procura de terapias coadjuvantes na Endodontia.

Após a revisão bibliográfica, verificou-se que a Terapia Fotodinâmica surge como uma promissora terapia coadjuvante em Endodontia, viabilizando a eliminação de microrganismos persistentes após a preparação químico-mecânica do sistema de canais radiculares, usando NaOCl.

A Terapia Fotodinâmica não deve substituir os procedimentos dos tratamentos convencionais, mas deve ser coadjuvante ao tratamento convencional, já que o laser de baixa intensidade é seguro e de fácil manipulação, além de promover acção antimicrobiana quando associado a um fotossensibilizador. É incontestável que no tratamento endodôntico convencional, as etapas de instrumentação, irrigação e medicação intracanal são essenciais para o sucesso do tratamento, contudo o aperfeiçoamento da técnica vem de encontro ao objectivo de proporcionar sempre um tratamento de maior qualidade. A capacidade de penetração do fotossensibilizador, bem como a capacidade de formação de oxigénio singuleto, podem ser factores importantes na eliminação de bactérias consideradas como persistentes em casos de re-infecção.

De acordo com os estudos analisados nesta revisão, a Terapia Fotodinâmica promoveu uma significativa redução do número de *Enterococcus faecalis* intracanal nos mais diversos parâmetros, mas evidenciam que esta terapia, apesar da sua eficácia, não erradica completamente a microbiota do canal.

Os resultados da presente revisão são limitados pela dificuldade de comparação entre os estudos, devido às diferenças metodológicas e protocolos que utilizam diferentes parâmetros, incluindo tempo de exposição, fluência de energia, potência do laser, concentração do fotossensibilizador. Em Endodontia diversos autores utilizaram

diferentes combinações entre esses parâmetros com resultados positivos, a maioria deles *in vitro*, sendo que, apenas dois deles *in vivo* (Garcez *et al.*, 2008 e Garcez *et al.*, 2010).

Desta forma, sugere-se que sejam desenvolvidos protocolos em relação aos parâmetros da luz, tempo de exposição e fotossensibilizadores mais eficazes em relação aos actualmente utilizados, além do desenvolvimento e da validação da metodologia, a fim de garantir uma directa comparação entre os estudos. Paralelamente, novos estudos, em especial *in vivo*, devem ser desenvolvidos para melhor comprovar o efeito antimicrobiano desta terapia, com o objectivo da sua utilização na prática diária clínica.

Concluindo, a Terapia Fotodinâmica aliada ao tratamento endodôntico convencional, é uma ferramenta útil na redução adicional da carga de *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares, mesmo quando em biofilme, com a vantagem de ser selectiva, de fácil aplicação, não promover resistência bacteriana e ser de baixo custo em relação ao laser de alta intensidade.



## 9. Referências Bibliográficas

1. American Association of Endodontics (2011). Glossário de termos. [Em linha]. Disponível em <http://www.aae.org/patients/patientinfo/references/endotermis/>
2. Baik JE, Kum KY, Yun CH, Lee JK, Lee K, Kim KK, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2008; 34(11): 1355-9.
3. Barbero I, Marquês D, Vaz H. Incisivo central maxilar com dos raízes: Caso clínico. *Endodoncia*. 2001; 19(4): 265-268.
4. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J*. 2008, 41(3): 227-39.
5. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J*. 2006<sup>2</sup>; 201(2): 101-5.
6. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J*. 2006<sup>1</sup>; 200(6): 337-41.
7. Bouillaguet S, Owen B, Wataha JC, Campo MA, Lange N, Schrenzel J. Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dent Mater*. 2008; 24(8): 1070-1076.
8. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985; 18(1): 35-40.
9. Carré V, Jayat C, Granet R, Krausz P, Guilloton M. Chronology of the apoptotic events induced in the K562 cell line by photodynamic treatment with hematoporphyrin and monoglucosylporphyrin. *Photochem Photobiol*. 1999; 69(1): 55-60.
10. Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/ steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod*. 2006; 32(1): 17-23.
11. Clarkson RM, Moule AJ, Podlich H, Kellaway R, Macfarlane R, Lewis D, *et al*. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite of varying compositions and concentrations. *Aust Dent J*. 2006; 51(3): 245-51.

12. Cohen S, Hargreaves KM. Caminhos da polpa. 9ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier; 2007;pp 40-58, 290-357; 460-510; 580-609.
13. Dickers B, Lamard L, Peremans A, Geerts S, Lamy M, Limme M, *et al.* Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(1): 81-5.
14. Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(3): 396-400.
15. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.* 2006; 32(6): 527-31.
16. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(4): 234-9.
17. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, *et al.* Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod.* 2008; 34(6): 728-34.
18. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, *et al.* *Lasers Surg Med.* 2007; 39(10): 782-7.
19. Gambarini G. Shaping and cleaning the root canal system: a scanning electron microscopic evaluation of a new instrumentation and irrigation technique. *J Endod.* 1999; 25(12): 800-3.
20. Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(4): e93-8.
21. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod.* 2008; 34(2): 138-42.
22. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with

- antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod.* 2010; 36(9): 1463-6.
23. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(1): 59-66.
  24. George S, Kishen A. Advanced noninvasive light-activated disinfection. Assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2007; 33(5): 599-602.
  25. George S, Kishen A. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *J Endod.* 2008; 34(9): 1119-23.
  26. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32(10): 937-40.
  27. Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(1): 132-5.
  28. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(2): 291-312.
  29. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 436-50.
  30. Hata G, Uemura M, Weine FS, *et al.* Removal of smear layer in the root canal using oxidative potential water. *J Endod.* 1996; 22(12): 643-5.
  31. Hu X, Ling J, Gao Y. Effects of irrigation solutions on dentin wettability and roughness. *J Endod.* 2010; 36(6): 1064-7.
  32. Jhamb S, Nikhil V, Singh V. An in vitro study of antibacterial effect of hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Indian J Dent Res.* 2010; 21(4): 512-4.
  33. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2006; 32(10): 946-50.

34. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20: 340-9.
35. Kaufman B, Spångberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. In endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod.* 2005; 31(12): 851-6.
36. Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay Ö, Sorkun K, *et al.* Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2011; 37(3): 376-81.
37. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(5): 308-20.
38. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochem Photobiol.* 2010; 86(6): 1343-9.
39. Kömerik N, Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol.* 2002; 92(4): 618-23.
40. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.
41. Lee JK, Baik JE, Yun CH, Lee K, Han SH, Lee W, *et al.* Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. *J Endod.* 2009; 35(2): 212-5.
42. Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34(5): 399-405.
43. Mahmoudpour A, Rahimi S, Sina M, Soroush MH, Shani S, Asl-Aminabadi N. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* from necrotic root canals using multiplex PCR. *J Oral Sci.* 2007; 49(3): 221-7.
44. Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2003; 29(4): 257-8.
45. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(2): 231-52.

46. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, *et al.* Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod.* 2011; 37(2): 217-222.
47. Ozbek SM, Ozbek A, Erdorgan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(5): 370-4.
48. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, *et al.* Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod.* 2010; 36(2): 322-8.
49. Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, *et al.* Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs.* 2011; 34(9): 889-897.
50. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod.* 2011; 37(6): 856-9.
51. Roças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.
52. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, *et al.* A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod.* 2008; 34(5): 541-5.
53. Schlafer S, Vaeth M, Hørsted-Bindslev P, Frandsen EV. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(4): 634-641.
54. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006; 32(3): 173-7.
55. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005; 38(10): 735-42.
56. Sedgley CM. The influence of root canal sealer on extended intracanal survival of *Enterococcus faecalis* with and without gelatinase production ability in obturated root canals. *J Endod.* 2007; 33(5): 561-6.
57. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in

- the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J*. 1997; 30(4): 279-82.
58. Siqueira JF Jr, Magalhães KM, Roças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2,5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod*. 2007; 33(6): 667-72.
  59. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000; 26(6): 331-4.
  60. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008; 34(11): 1291-1301.
  61. Siqueira JF Jr, Roças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009; 88(11): 969-81.
  62. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30(5): 297-306.
  63. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*. 2006; 32(10): 979-84.
  64. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, *et al*. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/ irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010; 36(2): 292-6.
  65. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006; 32(2): 93-8.
  66. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21<sup>st</sup> century. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(12): 2622-36.
  67. Ureña JL, Pérez AMC, García FG. Evolución histórica de la microbiología. Desarrollo de la microbiología oral, in Ureña JL (Ed). *Microbiología Oral*. 2002, 2ª edição, pp. 9-14, McGRAW-HILL, Madrid, Espanha.
  68. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001; 29(2): 165-73.

69. Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Microbiol.* 1997; 19(1): 75-80.
70. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(1): 13-28.
71. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod.* 2005; 31(12): 863-6.
72. Walton RE. Histologic evaluation of different methods of enlarging the pulp canal space. *J Endod.* 1976; 2(10): 304-11.
73. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, *et al.* Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod.* 2009; 35(11). 1567-72.
74. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32(5): 389-98.
75. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009; 35(7): 1051-5.